

Title	Bcl-2/E1B 19 kDa - interacting Protein 3 - like Protein (Bnip3L) Interacts with Bcl-2/Bcl-xL and Induces Apoptosis by Altering Mitochondrial Membrane Permeability
Author(s)	今津, 哲央
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41724
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について ご参照ください 。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏 名	いま づ てる お 今 津 哲 央
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 4 5 2 9 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 11 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科外科系専攻
学 位 論 文 名	Bcl - 2/E1B 19 kDa - interacting Protein 3 - like Protein (Bnip3L) Interacts with Bcl - 2/Bcl - x _L and Induces Apoptosis by Altering Mitochondrial Membrane Permeability (Bnip3 (Bcl-2/E1B 19 kDa 結合蛋白 3) 類似蛋白 Bnip3L は Bcl- 2/Bcl-x _L に結合しミトコンドリアの膜透過性を亢進してアポトーシ スを誘導する)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 奥山 明彦 (副査) 教 授 辻本 賀英 教 授 岡野 栄之

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

Bnip3 は、adenovirus E1B 19kDa 蛋白に結合する蛋白としてクローニングされ、アポトーシス抑制蛋白である Bcl-2 にも結合することが報告されている。我々は、Bnip3 蛋白と 56% のアミノ酸が一致する Bnip3L 蛋白をコードするヒト遺伝子のクローニングと、この Bnip3L を発現させた癌細胞が、増殖抑制されることを以前報告しており、今回、Bnip3L の詳細な機能解析を目的として、研究を行った。

【方法ならびに成績】

Bnip3L 蛋白は、そのアミノ酸配列から、BH3 ドメインと C 末端に疎水性アミノ酸からなる膜結合領域を有していた。BH3 ドメインは、アポトーシスを制御する Bcl-2 ファミリー内でよく保存された領域で、特にアポトーシス促進蛋白においては、細胞死誘導活性とアポトーシス抑制蛋白 (Bcl-2 や Bcl-x_L など) とのヘテロダイマー形成に必須であることが示されている。

COS-7 細胞に、N 末端に HA-tag を付加した Bnip3L 蛋白 (HA-Bnip3L) と Bcl-2・Bcl-x_L 各々の蛋白を発現させて、それぞれの特異抗体を用いて免疫沈降したところ、Bnip3L 蛋白は、Bcl-2 と Bcl-x_L 各々に対する結合能を持っていることが明らかになった。この結合能は、BH3 ドメインを欠失させたミュータント (Bnip3L-ΔBH3) では低下し、膜結合領域を欠失させたミュータント (Bnip3L-ΔC) では、完全に消失していた。

次に、Rat-1 細胞に HA-Bnip3L を発現させて細胞内局在を検討した。抗 HA 抗体を用いて免疫蛍光染色により検鏡したところ、Bnip3L は、ミトコンドリア膜蛋白である F₀F₁-ATPase と完全に一致する染色パターンを呈し、ミトコンドリアに局在することが示唆された。Bnip3L-ΔBH3 ではその局在に変化は認められなかったが、Bnip3L-ΔC では、その局在が細胞質へ移行した。

続いて Bnip3L の機能を解析するために、Bnip3L 蛋白を一過性に強制発現させたところ、Rat-1 細胞や HaLa 細胞でアポトーシスが誘導された。この細胞死誘導活性は Bnip3L-ΔC では消失したが、Bnip3L-ΔBH3 では低下するものの完全に消失するには至らなかった。

さらに、BH3 ドメインを有するアポトーシス誘導蛋白が、直接ミトコンドリアを標的として働くことが、近年、我々を含む複数のグループから報告されているため、単離ミトコンドリアを用いた実験系を利用して、Bnip3L のリコン

ビナント蛋白がミトコンドリアに与える影響を検討したところ、Bnip3Lのリコンビナント蛋白は、単離ミトコンドリアの膜電位を低下させ、チトクロムCを放出させた。

【総括】

Bnip3L 蛋白は Bnip3 蛋白のホモログで、BH3ドメインと疎水性アミノ酸からなる膜結合領域を有していた。Bnip3L 蛋白は他の BH3ドメインを有するアポトーシス促進蛋白と同様に、アポトーシス抑制蛋白（Bcl-2や Bcl-x_L）との結合能と、細胞死誘導活性を有しており、ミトコンドリアに局在していた。

Bnip3L 蛋白の BH3ドメインと膜結合領域の機能を明らかにするため、それぞれのミュータントを作成して検討した結果、膜結合領域がその機能発現に必須であることが判明し、同時に BH3ドメインも機能に関わることが明らかにされた。

さらに Bnip3L のリコンビナント蛋白は、単離ミトコンドリアの膜電位を低下させ、チトクロムCを放出させたことから、Bnip3L は BH3ドメインを有する細胞死誘導蛋白の一員であり、ミトコンドリアを標的として、細胞死を誘導することが示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究は、Bcl-2/アデノウイルス19kDa 蛋白に結合する Bnip3 蛋白のホモログである Bnip3L 蛋白分子の特徴について、解析、報告している。

Bnip3L 蛋白が、BH3ドメインと膜結合領域を有し、他の BH3ドメインを有するアポトーシス促進蛋白と同様に、アポトーシス抑制蛋白である Bcl-2と Bcl-x_Lに結合すること、ならびに、ミトコンドリアに局在し、細胞死誘導活性を有することを示し、さらに、Bnip3L 蛋白が、ミトコンドリアの膜電位を低下させ、チトクロムCを放出させることから、Bnip3L が BH3ドメインを有する細胞死誘導蛋白の一員であり、ミトコンドリアを標的として、細胞死を誘導することを明らかにしている。

近年解明されつつあるアポトーシスの分子機構において、ミトコンドリアの介在が重要視されているが、本研究は、分子生物学的手法を駆使して Bnip3L 蛋白を解析し、Bnip3L 蛋白がミトコンドリアを標的として働く細胞死誘導蛋白であることを見出すことにより、アポトーシスの分子機構解明に、大きく貢献した。

このことから、本研究は、学位の授与に値すると考えられる。